(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Breslau
Direktor: Professor Dr. Prausnitz)

Versuche zur Züchtung des Bacillus influenzae (Baz. Pfeiffer) auf synthetischen Nährböden

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

in der

Medizin und Chirurgie

bei der

Hohen medizinischen Fakultät

der

Schlesischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Breslau

vorgelegt von

Gottfried Petran
Arzt

Breslau 1927

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Breslau
Direktor: Professor Dr. Prausnitz)

Versuche zur Züchtung des Bacillus influenzae (Baz. Pfeiffer) auf synthetischen Nährböden

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

in der

Medizin und Chirurgie

bei der

Hohen medizinischen Fakultät

der

Schlesischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Breslau

vorgelegt von

Gottfried Petran
Arzt

Breslau 1927

Gedruckt mit Genehmigung der hohen medizinischen Fakultät der Schlesischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Breslau

Referent: Prof. Dr. Prausnitz

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Dem Andenken meines lieben Vaters

gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548211_0214

Während bei der üblichen bakteriologischen Nährbodentechnik das Ziel erstrebt wird, nach Möglichkeit mit einem Nährboden, unter Zufügung etwa noch notwendiger ergänzender Faktoren, ein möglichst günstiges Wachstum aller bisher züchtbaren Bakterien zu erreichen, verfolgt man bei der Anwendung synthetischer Nährböden ein anderes Ziel. Hier wollen wir nicht Massenkulturen unter optimalen Bedingungen, sondern gerade noch normal wachsende Kulturen unter den gerade noch zureichenden Bedingungen untersuchen, um den Verwendungsstoffwechsel (Braun) der einzelnen Arten kennen zu lernen; dabei leitet uns die Hoffnung, daß derartige Untersuchungen neue Möglichkeiten eröffnen zum Studium des Wesens der Pathogenität oder der Differentialdiagnose.

Zuerst hat wohl Pasteur diese Methoden ausgearbeitet und angewendet in der ausgesprochenen Absicht, nach dem Vorgange der Pflanzenphysiologie und Agrarkulturchemie die Bedingungen für das Wachstum der niederen Organismen festzustellen. Pasteur benutzte eine Lösung von Hefeasche und weinsaurem Ammoniak mit oder ohne Zucker in dest. Wasser, eine Methode, die wegen der mannigfachen Bestandteile der Asche nicht in strengem Sinne als synthetisch bezeichnet werden kann. Den strengen Anforderungen entsprechen eher die Nährböden von Uschinski, Proskauer, Beck und Capaldi, betreffend den Stoffwechsel des Tuberkelbazillus und der Typhus-Coli-Gruppe. Für unsere heutigen Anschauungen müssen wir aber vorzugsweise die Nährbodentechnik von Braun und seinen Mitarbeitern Cahn-Bronner, Stamatelakis, Kondo und Goldschmidt zugrunde legen. Wenn deren Versuche sich auf ganz andere Bakterienarten erstrecken als auf den I. B., — vorzugsweise Typhus-Coli-Gruppe, säurefeste Bakterien —, so muß ich doch auf die Veröffentlichungen genauer eingehen. Denn die Auswahl der in Frage kommenden Salze für meine Versuche habe ich nach ihren Angaben getroffen.

Zunächst war die Frage zu entscheiden, ob für diese Versuche ebenfalls der von den meisten Autoren benutzte flüssige Nährboden benutzt werden sollte, oder ob statt dessen feste gewählt werden dürften. Die Ernährungsverhältnisse beim I.B. liegen nach den neueren Untersuchungen so eigenartig, daß diese Frage noch nicht eindeutig beantwortet werden kann. Braun hat mit Bakterien arbeiten können die einen verhältnismäßig leicht übersehbaren Stoffwechsel haben, aber bereits bei seinen Versuchen hat sich gezeigt, daß eigentlich nur Versuche in Quarzgefäßen, in denen jede Alkaliabgabe unmöglich ist, beweisend sind, wenn man nicht noch hinzunimmt, daß nach seinen neuesten Untersuchungen selbst die Luft des Brutschrankes als Lieferant von Stickstoff und somit als Fehlerquelle dienen kann. Sie haben deshalb vom festen Nährboden abgesehen, nachdem sie zuerst einmal festgestellt hatten, daß Agar-Agar nicht genügend gereinigt werden könnte, um lediglich als Gallerte, ohne Salze, zu wirken. Aber auch so reichen die Bedingungen noch nicht aus, um sichere Urteile zu gewinnen. Auf Grund ihrer Erfahrungen und theoretischer Erwägungen stellten sie die Forderung auf, daß erst die fortlaufende Züchtung in Passagen auf dem künstlichen Nährsubstrat beweisend für eine ausreichende Eignung sei. Auf Grund der besonderen Ernährungsbedingungen des I.B. kann man aber zurzeit derart formulierte Züchtungsbedingungen nicht erfüllen, sondern muß anders vorgehen.

Die Bakterien, die auf dem üblichen Nähragar leicht zu züchten sind, scheinen auch auf synthetischem Nährboden leicht züchtbar zu sein. Selbst bei den Tuberkelbazillen ist es gelungen, diese Fragen annähernd zu beantworten, obwohl gerade hier die Nährbodenfrage früher sehr kompliziert zu sein schien. Sie wachsen nach Kondo und Braun in einem Nährboden, der an Mineralien Schwefel, Phosphor und Magnesium, als N-Quelle Ammoniak oder ein Nitrat und als C-Quelle niedrige organische Säuren, z. B. Essigsäure, gebraucht. Glyzerin ist eine sehr gut ausnutzbare C-Quelle.

Es gibt aber eine Anzahl besonders anspruchsvoller Bakterien, bei denen immer hochwertige Nährstoffe, wie natives, nicht erhitztes Eiweiß, z. B. Aszites oder Blut in gekochtem oder ungekochtem Zustande den üblichen Nährböden zugefügt werden müssen. Man hat früher den Eiweißgehalt dieser Zusätze für das wesentliche angesehen. Jetzt sehen wir darin mehr die Wirkungen vitaminähnlicher Stoffe. Es handelt sich hier um die Meningokokken, Gonokokken, Streptokokken und die hämophilen Bakterien, vor allem den I.B.

Ueber die Biologie des I.B.

Pfeiffers Entdeckung, daß der I. B. nur auf bluthaltigen Nährböden wächst, ist im Laufe der letzten Jahre noch weiter differenziert worden. Hier sind, unter Weglassung der älteren Literatur, die ausführlich bei Knorr und Kollath zusammengestellt ist, die Arbeiten von Davis, Thötta und Avery, Knorr, Gehlen und Kollath zu nennen. Durch die Arbeiten der drei zuerst genannten Autoren hat sich herausgestellt, daß zwei verschiedene Wachstumsfaktoren im Blute vorhanden sind, von denen der eine Vitamincharakter hat und als V-Faktor, der andere nicht näher definierbar als X-Faktor bezeichnet wurde. In weiteren Versuchen, bei denen neben den eben genannten Autoren noch Knorr und Gehlen besonders erwähnt werden müssen, sind die chemischen und physikalischen Einflüsse auf diese beiden Faktoren genauer studiert. Kollath endlich hat sich in seinen Arbeiten vorzugsweise mit den Fragen nach dem Wesen dieser Substanzen beschäftigt.

Um diese Fragen beantworten zu können, hat Kollath einen anderen Weg eingeschlagen als die Autoren vor ihm. Es war bekannt, daß diese beiden Faktoren nicht nur im Blut, sondern auch in Pflanzen, aber immer gemeinsam vorkommen. Es war somit nicht möglich, die eine Substanz zu studieren, ohne die andere gleichzeitig zu beeinflussen. Infolgedessen ging Kollath darauf aus, diese beiden Substanzen jede getrennt für sich aus anderem Aus-

gangsmaterial zu erhalten. Es gelang ihm durch hochgradige Verdünnung des Blutes, den V-Faktor auszuschalten und lediglich den X-Faktor übrig zu behalten. Die Gewinnung des isolierten V-Faktors gelang ihm durch Extraktion steriler Pflanzenteile bei tiefer Temperatur, eventuell nach vorheriger kurzer Erhitzung, um störende Fermente zu vernichten. Fügte er diesen beiden nunmehr völlig getrennt zu behandelnden Faktoren zu gewöhnlichem Nähragar, dann bekam er einen Nährboden, der dem üblichen Levinthal-Agar nicht nachstand. Er hatte es nun in der Hand, jeden Faktor für sich zu behandeln. Bei diesen Versuchen hat er zeigen können, daß der X-Faktor einen sauerstoffaktiven Mineral (Eisen oder Mangan) entspricht, das in idealer Form im Blutfarbstoff vorhanden ist, das sich aber auch in gleicher Form in Pflanzen findet und nach vorheriger Bestrahlung von Ferrozyankalium mit U.V.L. aus einer Vorform durch bestimmte Bakterien zu dem endgültig wirksamen Stoffe aufgebaut werden kann. Die genaue chemische Definition dieses X-Faktors ist bisher noch nicht gelungen. Das gleiche gilt vom V-Faktor. Er ist identisch mit wasserlöslichen, nativen, pflanzlichen Phosphatiden (Cranner), deren chemische Konstitution ebenfalls noch nicht bekannt ist. Man arbeitet deshalb bei Züchtungsversuchen des I.B. noch immer mit mehreren chemisch unbekannten Größen, ganz abgesehen davon, daß der übrige Mineralbedarf und Eiweißbedarf noch völlig ununtersucht ist. Besondere Schwierigkeiten bestehen bei dem Nachweis, daß in der Tat das Eisen in einer bestimmten sauerstoffaktiven Form das wesentliche Moment des X-Faktors darstellt, da alle in üblicher Weise hergestellten Nährböden Eisen enthalten, sei es aus dem Blut, sei es aus den Verunreinigungen der Soda, die für die Alkalisierung verwendet wird. X und V, zu Wasseragar zugesetzt, ergeben nach Kollaths Versuchen kein Wachstum der I.B. Er hat früher noch außerdem den Mineral- und Eiweißgehalt des Nähragars als notwendig vermutet. Deshalb ist eine Feststellung des Salzbedürfnisses des I.B. und eine Vereinfachung des Nährbodens in der Art, daß der übliche Fleischwasser-Peptonagar fortfällt, für die weitere Definition der beiden wachstumsfördernden Faktoren unbedingt notwendig geworden, da nur auf diesem „synthetischen" Wege sichere Eisenfreiheit des Nährbodens zu erreichen ist. Auf Kollaths Anregung habe ich deshalb die im folgenden zu schildernden Versuche unternommen, in denen die spezielle Fragestellung lautete: Läßt sich nachweisen, daß der I.B. neben X- und V-Substanz noch chemisch bereits genau definierte Stoffe aus der Gruppe der Mineralien oder der organischen Verbindungen braucht und läßt sich auf Grund dieser neu zu gewinnenden Daten ein sicher eisenfreier Nährboden herstellen, der als Basis für die weitere Forschung nach dem Wesen der wachstumsfördernden Stoffe dienen kann?

War schon aus diesen Gründen eine chemisch einwandfreie Technik nicht möglich, so komplizierte sich die Frage noch durch die von Kollath gezeigte Tatsache, daß I.B. durch reichliche Ueberimpfung auf festen und natürlich auch auf flüssigen Nährboden ein Scheinwachstum zeigen können. Durch die Diffusionsvorgänge im Nährboden können Stoffe aus den jedesmal mitübertragenen toten Bakterien in den Nährboden diffundieren und dann von den noch überlebenden verwendet werden. Kollath hat für diese Erscheinung den Ausdruck „Kannibalismus" vorgeschlagen. Diese Diffusion muß sich natürlich in einem flüssigen Nährboden infolge der Flüssigkeitsströmungen und der leichteren Diffundierbarkeit noch viel stärker als auf einem festen Nährboden auswirken und deshalb noch mehr ein Wachstum dort vortäuschen, wo es in Wirklichkeit gar nicht möglich ist. Auch läßt sich auf einem festen

Nährboden eine viel exaktere Kontrolle über die Stärke des Wachstumseinflusses durch Berücksichtigung der Koloniengröße ausüben. Aus diesen Gründen zogen wir daher einen festen Nährboden bei allen unseren im folgenden noch zu beschreibenden Versuchen einem flüssigen vor wenn auch durch das Zufügen des Agars wieder neue chemische Einflüsse hinzukamen. Nach Kollaths Versuchen ist der Wert eines Nährbodens nur dann gut zu beurteilen, wenn man in der Form des Verdünnungsausstriches isolierte Kolonien bekommt, deren Größe gleichzeitig ein Maß für die Güte des Nährbodens abgibt. Selbstverständlich bedarf es auch hier der Züchtung in Passagen und vor allem regelmäßiger mikroskopischer Kontrolle, ob die Formen des I.B. normal sind. Als Forderung wurde deshalb für diese Versuche aufgestellt: Neben den beiden unbekannten Größen X und V, dem ebenfalls nicht genauer definierten gewaschenen Agar-Agar, der als Grundlage für den festen Nährboden benutzt wurde, sollten Salze zugesetzt werden, und es sollte beobachtet werden, ob dabei bestimmte Verbindungen zu finden waren, die für das Wachstum des I.B. außerdem notwendig sind. Als Beweis für die Brauchbarkeit diente die Bildung von isolierten normalen Kolonien in Passagen und die normale Formgebung der I.B., ebenfalls in Passagen.

Auswahl der Salze.

Da eine ähnliche Versuchsreihe bisher noch nicht für den I.B. angestellt ist, mußte die Auswahl der zu verwendenden Salze nach den Ergebnissen getroffen werden, die bisher bei der Züchtung von anderen Bakterien auf synthetischen Nährböden gewonnen sind. Hier liegen, wie oben erwähnt, die ausführlichsten Untersuchungen für die Gruppe der säurefesten Bakterien, der Typhus-Coli-Gruppe, des Proteus und der Hefen vor; aber auch für zahlreiche andere Bakterien ist bereits ein Ueberblick über den Mineralstoffwechsel gewonnen.

Nach Kruse (S. 92f.), dessen Darlegungen ich hier folge, bedürfen die höheren Pflanzen zu ihrer Ernährung außer dem C, H, O und N noch der Elemente S, P, K — das überall notwendige Na erwähnt Kruse wohl als selbstverständlich nicht —, Ca, Mg und Fe, die ihnen gewöhnlich in Form anorganischer Salze geliefert werden. Niedere Algen sollen allerdings auch das Ca (Molisch) und K (Benecke) entbehren können. Schon Raulin fand, daß Schimmelpilze auch vorzüglich auskommen mit anorganischen Salzen, die nur Schwefelsäure, Phosphorsäure, Kalium und Magnesium enthalten. Freilich wird das Wachstum verstärkt durch geringe Zusätze, einige Zentigramme im Liter der Nährflüssigkeit, von Kieselsäure, Eisen und merkwürdigerweise besonders von Zink. Es sei hier auf die Bedeutung des Zinkes für Aspergillus, höhere Pflanzen und Tiere nach den neueren Arbeiten von Drinker und Collier hingewiesen (Journ. of industr. Hyg. Vol. 8. 1926. p. 257). Die Möglichkeit, daß mit der Phosphorsäure und Schwefelsäure dem Kalium und Magnesium der Aschenbedarf der meisten Mikroorganismen gedeckt werden kann, ist auch auf Grund der späteren Untersuchungen kaum noch zu bezweifeln. Die Tuberkelbazillen nehmen z. B. nach Proskauer und Beck mit Monokaliumphosphat und Magnesiumsulfat vorlieb, die Schimmelpilze begnügen sich nach Naegeli ebenfalls mit den 4 Elementen, nur die Hefe scheint neben dem Magnesium noch des Kalziums zu bedürfen. Werden Schwefelsäuren und Phosphorsäuren den Keimen auch nicht direkt geboten, so muß man trotzdem annehmen, daß sie in irgendeiner Form als Verunreinigung doch im Nährboden vorhanden sind. Phosphorsäure z. B. kann auch an Nukleïnsäure gebunden dargereicht werden. Naegeli hat ferner angegeben, daß der Schwefel auch aus schweflig- und unterschwefligsauren Salzen, Sulfosäuren und Albuminaten entnommen werden könnte, nicht dagegen aus Sulfoharnstoff und Rhodanverbindungen. Schwefelwasserstoff, Schwefel und niedere Oyxdverbindungen des Schwefels dienen den sog. Schwefelbakterien Winogradskys und Beijerincks nicht nur als Schwefelquelle sondern auch als Kraftquelle anstelle anderer Nahrungsmittel. Trotz der nachweislichen Unentbehrlichkeit des Schwefels im allgemeinen gibt es manche niedere Organismen, die nachweislich ohne Schwefel auskommen können, wie aus Analysen von einigen bakteriellen Eiweißkörpern und auch von ganzen Bakterien hervorgeht. De Schweinitz und Dorset fanden dies z. B. bei der Asche des Tuberkelbazillus. Doch haben sich diese Autoren einer Methode bedient (vorheriges Waschen der Tuberkel-Bazillen, dann Extraktion mit Alkohol und Aether), die ihre Befunde als nicht beweiskräftig

erscheinen läßt, zumal doch bei der Züchtung auf synthetischem Nährboden immer Schwefelverbindungen notwendig waren (Proskauer u. Beck, Magnesiumsulfat, Braun und Kondo).

Was Kalium und Magnesium betrifft, so behauptet Naegeli, daß Kalium nicht durch Natrium und Lithium, sondern durch Rubidium und Caesium, Magnesium durch Kalzium, Barium oder Strontium ersetzt werden könne. Mit einigen Einschränkungen für die erste Hälfte dieses Satzes hat Bennecke dies auch bestätigen können. Unersetzlich scheint dagegen das Magnesium zu sein. Doch liegen auch schon andere Versuche vor, die beweisen, daß das Aschenbedürfnis ein recht verschiedenes ist. So scheinen Bakterien wie Azotobacter, Chroococcum, die den freien Stickstoff der Atmosphäre assimilieren können, nur des Kalkes und der Phosphorsäure, nicht aber der Alkalien zu bedürfen. Baz. Stutzeri und Hartlebi können nach Salzmann ihren Mineralbedarf aus Kalium und Phosphorsäure decken, wenn ihnen daneben noch eine Spur von Schwefelsäure geboten wird.

Ueber die Bedeutung des Eisens für die Kleinwesen weise ich auf das hin, was ich oben schon bei der Erwähnung der Versuche Kollaths mit dem I. B. mitgeteilt habe, der Eisen in der Asche gewaschener I. B. feststellen konnte. Bekannt ist auch die Beziehung des Eisens zu der Vegetation der sogen. Eisenbakterien (Crenothrix polyspora, Leptothrix und Cladothrix ochracea usw.), d. h. fädiger Organismen, die in ihrer Scheide Massen von Eisenoxydhydrat anhäufen. Dabei kann das Eisen auch durch Mangan ersetzt werden.

Bezüglich der Wandlungen dieser anorganischen Stoffe im Bakterienleib sagt Kruse: „Daß diese Stoffe bei dem Aufbau der Körpersubstanzen, und zwar in erster Linie des Eiweißes, eine gewisse Rolle spielen, ist aus den Analysen der Mikroorganismen selbst wie aus den Erfahrungen, die man sonst über die Zusammensetzung des Protoplasmas gemacht hat, zu schließen."

„Am meisten interessiert die Phosphorsäure, nicht nur wegen ihrer Unentbehrlichkeit, sondern auch, weil wir von der Phosphorsäure annehmen können, daß sie bei der Synthese des Eiweißmoleküls teilweise mit diesem in engere Verbindung tritt. Eine Rolle spielt die Phosphorsäure weiter mit Lezithin. Die Phosphorsäure wird wieder frei bei der Zersetzung der Eiweißstoffe durch die Mikroben der Fäulnis und Verwesung. Diese Spaltungen sind wahrscheinlich enzymatischer Natur. Eine einfachere Art, also wohl bloße Lösung durch Säurebildung hervorgerufen, dieser Veränderungen liegt nach Stoklasa, Duchacek und Petra bei den ammoniakbildenden Bakterien, wie dem Baz. mycoides, vor, der am meisten (bis zu 23 Proz.) Knochenphosphat löst, und zwar durch die Kohlensäure, die sie nebenbei entwickeln. Auch andere Salze, z. B. kohlensaurer Kalk, können natürlich durch Kohlensäure oder organische Säuren, die im Stoffwechsel der Mikroorganismen entstehen, gelöst, und umgekehrt lösliche Salze z. B. des Kalziums und Magnesiums durch Bildung alkalischer Produkte (kohlensaures Ammoniak), die des Eisens und Bleis durch Schwefelwasserstoffentwicklung gefällt werden."

Bei meinen Versuchen haben sich nun eine Anzahl sicherer Befunde ergeben, die dafür sprechen, daß diese Anschauungen auch für den Bac. influenza Geltung haben.

Eigene Versuche.

Als Agar wurde Stangenagar verwandt, der erst trocken abgewogen und dann mehrere Tage mit oft gewechseltem Aq. dest. extrahiert wurde. Dann wurde er 2½proz. zu Aq. redest. zugesetzt und im Autoklaven sterilisiert. Alle Glasgefäße, die ich gebrauchte, bestanden aus neuem, ungebrauchtem Jenaer Glas. Den schon im vorhergehenden öfter genannten X-Faktor gewann ich aus gewaschenen Menschenblutkörperchen, denen in gleicher Menge destilliertes Wasser zur Hämolyse zugesetzt wurde. Den V-Faktor gewann ich aus gewöhnlichen gelben Erbsen in folgender Weise: Die saubergewaschenen Erbsen wurden in größeren Schalen mit Wasser übergossen, das einen geringen Alkoholzusatz erhielt, und mehrere Tage stehen gelassen. Dieser Extrakt wurde durch Papierfilter mehrfach filtriert bis zur Klärung und dann im Faust-Heimschen Apparat bei 37° eingeengt, durch Berkefeld-Filter filtriert und steril abgefüllt[1]). Die Herstellung der Salzlösungen geschah unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes folgendermaßen. Es wurden gelöst:

1) Es enthält neben den Phosphatiden noch andere organische und anorganische Verbindungen, ist aber eiweißfrei.

$NaH_2PO_4 + 2\,H_2O$	15,4 g	in	100,0	Aq.	red.
$Na_2PHO_4 + 12\,H_2O$	14,2 „	„	„	„	„
$Na_3PO_4 + 12\,H_2O$	16,4 „	„	„	„	„
KH_2PO_4	13,6 „	„	„	„	„
K_2CO_3	13,8 „	„	„	„	„
$KClO_3$	9,9 „	„	„	„	„
K_2SO_4	14,4 „	„	„	„	„
NH_4Cl	5,3 „	„	„	„	„
Na_2CO_3	36,6 „	„	300	„	„
NaCl	17,4 „	„	„	„	„
$CaCO_3$	gesättigte Lösung				
Asparagin	„	„			

Die Lösungen wurden 2 Std. im Autoklaven sterilisiert und später dem Agar kurz vor dem Erkalten zugesetzt. Eine Verwendung der einzelnen Salze war zunächst von vornherein nicht beabsichtigt. Deshalb stellte ich mir verschiedene Salzgemische her.

Es wurden folgende 6 sterile Salzgemische in kaltem Zustande kombiniert und ihre Wirkung auf I.B. erprobt:

1) NaCl NaH_2PO_4 Na_2CO_3 NH_4Cl	2) $KClO_3$ KH_2PO_4 K_2CO_3 NH_4Cl	3) NaCl NaH_2PO_4 Na_2CO_3 Asparagin
4) $KClO_3$ KH_2PO_4 K_2CO_3 Asparagin	5) NaCl $KClO_3$ NH_4Cl Na_2CO_3	6) NaCl $KClO_3$ Asparagin Na_2CO_3

Die Gemische waren derartig gewählt, um in den verschiedenen Nährböden Na, K, PO_4, NH_4 und Asparagin getrennt oder in derschiedenen Kombinationen zu verwenden. Der besondere Zusatz von Na_2CO_3 bei Gemisch 5 und 6 wurde zur Alkalisierung in Mengen von 5 ccm notwendig. Es wurden im übrigen je 20 ccm dieser Molekularlösungen gemischt und dann mit Sodazusatz gegen Lackmus neutralisiert, bis alle Lösungen alkalisch reagierten. Die Anordnung des ersten Versuches geht aus Tabelle I hervor.

Tabelle I.

Eisenfreier Wasseragar (Aq. red.) 2½ Proz., mit den verschiedenen Salzgemischen. Dazu kommen die Zusätze in Kolumne I—VI. Der Blutzusatz wurde gewählt, um eventuell hemmende Einflüsse der Salzgemische festzustellen. Er reichte aber auch allein nicht zum Wachstum der I. B. aus.

	I	II	III	IV	V	VI
	Ohne weiteren Zusatz	X-Substanz	0,5 % Blut	Phosphatid	X + Phosphatid	X + Phosphatid + Pepton
Wasseragar, allein	—	—	—	—	—	—
Salzgemisch 1 Na, Cl, PO_4, CO_3, NH_4	—	—	+[1]	—	(+)[1]	++[1]
Salzgemisch 2 kein Na, dafür K	—	—	—	—	—	—
Salzgemisch 3 Na, Asparagin	—	—	—	—	—	—
Salzgemisch 4 kein Na, dafür K, Aspar.	—	—	—	—	—	—
Salzgemisch 5 Na, K, NH_4	—	—	++[2]	—	+[2]	+[1]
Salzgemisch 6 Na, K, Asparagin	—	—	(+)[3]	—	+[3]	+[3]

Von allen Stammlösungen je 1 ccm zu 10 ccm Agar.

1) Mikroskopisch: IB blaß, gequollen, Form klein, annähernd typisch.
2) „ IB lange Faden, Kügelchen, bei Peptonzusatz außerdem reichlich normale Formen.
3) „ IB polymorph.

Zeichenerklärung: (+) mit schwacher Vergrößerung im Mikroskop gerade erkennbare Koloniebildung.
\+ mit 10facher Lupe gerade erkennbare Koloniebildung.
++ mit bloßem Auge gut erkennbare Koloniebildung.

Damit wurde zunächst grundsätzlich festgestellt, welche Kombinationen überhaupt Wachstum ergaben. Da bei Salzgemisch 1, 5 und 6, das NaCl, NaH_2PO_4, Na_2CO_3 und NH_4Cl enthielt, anscheinend die besten Resultate zu erzielen waren, d. h. neben guten Kolonien vorzugsweise normale Formen der I.B., so wurden nunmehr die Bestandteile dieses Gemisches gegenseitig kombiniert zwecks Ausschaltung etwa unnötiger Bestandteile:

Je 10 ccm Wasseragar erhielten neben je zwei Oesen Blut als X-Faktor und je 1 ccm Erbsenextrakt als V-Faktor der Reihe nach je 1 ccm Lösung der folgenden einfachen Salze bzw. ihrer Verbindungen:

1) NaH_2PO_4
2) NaCl
3) Na_2CO_3
4) NH_4Cl
5) NaH_2PO_4 + NaCl
6) **NaH_2PO_4 + Na_2CO_3**
7) NaH_2PO_4 + NH_4Cl
8) NaCl + Na_2CO_3
9) NaCl + NH_4Cl
10) Na_2CO_3 + NH_4Cl
11) NaH_2PO_4 + Asparagin
12) Asparagin

Es ergab sich hier zunächst nur bei dem Gemisch 6 ein sehr schwaches Wachstum, weil die meisten Nährböden sauer reagierten. Sobald aber diese selben Nährböden mit Soda vorsichtig alkalisiert wurden, zeigte sich das Resultat von Tabelle II.

Tabelle II.

Kombinationen von Salzgemisch 1[1]).

X- u. V-Substanz +	Wachstum	Mikroskopisch
1) NaH_2PO_4 1 ccm NaCl 1 ccm Na_2CO_3 1 ccm	+	IB, normale Form
2) NaH_2PO_4 1 ccm NH_4Cl 1 ccm Na_2CO_3 1 ccm	++	IB, groß und plump
3) NaCl 1 ccm NH_4Cl 1 ccm Na_2CO_3 0,5 ccm	(+)	IB, sehr groß und plump
4) NaH_2PO_4 1 ccm Na_2CO_3 0,5 ccm Asparagin 1 ccm	+	IB, meist normale Formen

1) Zeichen wie in Tabelle I.

Hieraus ergibt sich, daß zwar alle 4 Arten Wachstum ergaben, natürlich immer nur in Gemeinschaft mit X und V, daß aber der Mangel an Phosphat sich deutlich bemerkbar macht (Reihe 3). Der N-Bedarf konnte gedeckt werden aus dem Nährboden, ohne weiteren Zusatz, aber auch durch NH_4Cl. Die Formen waren dann normal. NH_4Cl und Asparaginzusatz wirkten ebenfalls, letzteres schwächer. Da die kräftigste Koloniebildung bei Zusatz von NH_4Cl

stattfand, wurde diese Kombination 2 weiter untersucht. Es stellte sich also bei diesem Versuche heraus, daß NaH_2PO_4, NH_4Cl und Na_2CO_3 — letzteres vorzugsweise zur Herstellung des richtigen Alkaleszenzgrades — am günstigsten wirkten. In der Absicht, möglichst nur mit anorganischen Verbindungen zu arbeiten, habe ich dann NH_4Cl und NaH_2PO_4 in verschiedenen Mengen gegeneinander ausgewertet und in der üblichen Weise mit Soda diese Lösungen alkalisiert.

Zunächst wurden in einem Vorversuche je 0,1, 0,2, 0,4 und 0,8 ccm von der NaH_2PO_4 und Na_2CO_3-Lösung teils für sich allein, teils mit 0,1, 0,2, 0,4 und 0,8 ccm der NH_4Cl-Lösung versetzt. Dies ergab 20 verschiedene Kombinationen. Es zeigte sich, daß bei den kleineren Dosen das Wachstum ausblieb und bei den größeren anstieg. Am günstigsten schienen die Gemische von 0,1 bis 0,8 NaH_2PO_4 + Na_2CO_3 mit 0,4 und 0,8 NH_4Cl zu sein. Diese wurden noch einmal durchuntersucht, und es ergab sich der Befund der Tabelle III.

Tabelle III.

1)	0,1	NaH_2PO_4	+	0,1	Na_2CO_3	+ 0,4	NH_4Cl	— keine Fortzüchtmöglichkeit.
2)	0,2	„	+	0,2	„	+ 0,8	„	— bis zur 1. Generation schwaches Wachstum
3)	0,4	„	+	0,4	„	+ 0,2	„	— „ „ „ „ „
4)	0,4	„	+	0,4	„	+ 0,8	„	— bis zur 5. Generation gutes Wachst.
5)	0,8	„	+	0,8	„	+ 0,8	„	— kein Wachstum.

Bei allen Kulturen noch zahlreiche Degenerationsformen.

Hieraus ergibt sich, daß bei dem Mengenverhältnis 0,4 NaH_2PO_4, 0,4 Na_2CO_3 und 0,8 NH_4Cl das beste Wachstum und Fortzüchtung zu erzielen waren trotz der stets dabei auftretenden Degenerationsformen des I.B. Es schien also dem I.B. immer noch ein Stoff zum Aufbau seiner Leibessubstanz und Besserung seines Wachstumes zu fehlen, den wir nunmehr durch den Zusatz von organischer Substanz zunächst in Gestalt von Pepton in folgender Weise zu bieten suchten, obwohl hierdurch neben X, V und dem Agar eine vierte chemische, noch nicht genau zu definierende Substanz eingefügt wurde.

Der Nährboden war noch bei dem Na_2CO_3-Zusatz zu stark alkalisch, so daß die Sodamenge etwas reduziert wurde. Bisher wurden die Versuche der besseren Uebersichtlichkeit halber mit 10 ccm Agar angestellt. Da aber hier leicht Austrocknungsvorgänge auftraten, wurden von jetzt ab 15 ccm verwendet. Um deshalb die richtige Salzkonzentration wie bei Versuch 4 in Tabelle III zu erhalten, nahm ich auf 10 ccm Wasseragar 0,6 ccm der Molekularlösung von NaH_2PO_4, 0,5 ccm Na_2CO_3 und 1,2 ccm NH_4Cl und der Reihe nach 0,2, 1,0, 3,0 und 5,0 ccm einer 5proz. Peptonlösung[1]). Da die letzte Platte 15 ccm Substanz im ganzen enthielt, füllte ich die anderen Platten durch den entsprechenden Zusatz von Aq. red. ebenfalls alle auf 15 ccm Substanz insgesamt auf. Statt 1 ccm Erbsenextrakt wie bisher nahm ich dieses Mal auch je 2 ccm Erbsenextrakt. Gleichzeitig wurden 3 Oesen Blut zugesetzt, da Kollath 1 Oese auf je 5 ccm als minimale Dosis festgestellt hat. Dabei zeigte sich das Resultat von Tabelle IV, S. 37.

An Formen waren bei Zusatz von 0,2 ccm—5proz. Peptonlösung durch mehrere Generationen hindurch nunmehr fast ausschließlich normale I.B. vorhanden, während bei höherem Zusatz von Pepton bereits in den 2. Generationen Zerfallsformen auftraten und bei 5 ccm Zusatz der Peptonlösung über-

1) Wir verwendeten Pepton Witte, das uns sicher eisenfrei durch Herrn Dr. Dragendorf bei Witte, Rostock, zu Verfügung gestellt wurde. Wir sagen dafür auch hier unseren Dank.

Tabelle IV.

Austitrieren von Pepton 5proz. mit der Lösung, die 0,6 NaH_2PO_4, 0,5 Na_2CO_3, 1,2 NH_4Cl enthielt auf 15 ccm Gesamtmenge.

ccm der 5proz. Peptonlösung	Wachstum der I. B.
0,2	++
1,0	+
3,0	+
5,0	—

haupt kein Wachstum mehr auftrat. Damit war die Möglichkeit gegeben, nunmehr mit größeren Agarmengen zu arbeiten und Reihenversuche anzulegen.

Ausgehend von der Zusammensetzung der Platte 1 in Tabelle IV 0,2 ccm 5proz. Peptonlösung hatte ich mir den Nährboden unter gleichzeitiger Umrechnung der molekularen Lösungen auf den Prozentgehalt folgendermaßen in größerer Menge herstellen müssen.

NaH_2PO_4 = 6,16 g in 1000 g Aq. red.
NaH_4Cl = 4,24 g in 1000 g Aq. red.
Pepton = 1 g in 1000 g Aq. red.

Die Werte für NaH_2PO_4 und NH_4Cl wurden abgerundet in 6,0 bzw. 4,3, und diese Menge in je 100 ccm Aq. red. getrennt gelöst und dann sterilisiert. Das 1 g Pepton wurde in 100 ccm Aq. red. gelöst und sterilisiert.

Von dem Stangenagar löste ich 20 g Trockengewicht in 700 g Aq. red. nach eintägigem Waschen auf. Nach dem Sterilisieren setzte ich die sterilen Lösungen von NaH_2PO_4 und NH_4Cl hinzu und alkalisierte die ganze Lösung durch Zusatz in steriler Sodalösung gegen Lackmus bis zur schwachen Blaufärbung. Darauf wurde die Lösung auf Röhrchen in folgender Weise abgefüllt.

20 Röhrchen enthielten je 9 ccm der obengenannten Mischung und je 1 ccm der genannten Peptonlösung hinzugesetzt. Den Rest füllte ich zu je 10 ccm in Röhrchen ab — also ohne Peptonzusatz —, um damit Versuche mit einzelnen Aminosäuren anstellen zu können, die ich weiter unten noch schildern werde.

Mit den Röhrchen, die den Peptonzusatz enthielten, führte ich den in Tabelle IV dargestellten Versuch nochmals durch — natürlich enthielt jede Platte noch 2 Oesen Blut als X-Faktor und je 1 ccm Erbsenextrakt als V-Faktor — mit dem Erfolg, daß ich einwandfreie Passagen und fortlaufend normales Wachstum der I. B. erhielt in sechs Generationen.

Bei dem Zusatz von Aminosäuren[1]) an Stelle des bisher verwendeten Peptons erhielt ich nunmehr das Resultat, daß 1proz. Cystin, 1proz. Tyrosin und 1proz. Leucin in absteigender Folge Wachstum ergaben, Tryptophan und d-Alanin aber sich als ungeeignet erwiesen. Damit war ein sicheres Resultat erreicht. Ein Wasseragar, der NaH_2PO_4, NH_4Cl und Na_2CO_3 an anorganischen Salzen und Pepton, X und V enthält, ergibt ein ausreichendes Wachstum der I.B. mit isolierter Koloniebildung, normalen Wuchsformen und Züchtung in Passagen. Er ist völlig eisenfrei zu erhalten, vorausgesetzt, daß alle verwendeten Reagenzien vorher genauestens geprüft werden.

Bezüglich des Mineralverwendungsstoffwechsels geht also aus diesen Versuchen hervor, daß der I.B. mit sehr wenig Bausteinen auskommt, wenn er das O_2 übertragende Fe und das Phosphatid zur Verfügung hat. Ihm genügen dann Na, PO_4 als Mineralien und NH_4 als N-Quelle. K. ist scheinbar nur in den geringen Mengen, wie sie in den übrigen Teilen des Nährbodens vorhanden sind, ausreichend. Ein höherer Gehalt scheint schädlich zu sein. Es ist jedenfalls nicht in der Lage, das Na zu ersetzen. Eine besondere C-Quelle ist neben den im Agar

1) Die Aminosäuren verdanke ich Herrn Prof. Dr. Paul Hirsch, Oberursel, wofür ich ihm auch an dieser Stelle meinen ergebensten Dank ausspreche.

und Phosphatid bereits möglichen Bestandteilen nicht notwendig. Dabei muß vorläufig dahingestellt bleiben, inwiefern auch noch Spuren anderer Mineralien, wie sie sicher im Agar und meist gekoppelt mit den Phosphatiden vorkommen, neben den gefundenen einfachen, anorganischen Salzen notwendig sind. Es ergibt sich insgesamt aber, daß es möglich ist, einen völlig fleischwasser- und eisenfreien Nährboden für die weitere Untersuchung von X und V anzuwenden, ein Ergebnis, das bei Beginn dieser Versuche als Ziel vorschwebte.

Zusammenfassung.

1) Wenn der Alkaleszenzgrad mit Soda richtig eingestellt ist, braucht der I.B. zum Wachstum neben X- und V-Substanz noch Na, PO_4 und NH_4 als Stickstoffquelle. Asparagin wird nicht so gut ausgenutzt. — 2) Als Eiweißsubstanz reicht gerade der Agargehalt der Platte sowie die Eiweißmenge, die mit der X-Substanz zugefügt wird, aus. Es treten aber dabei noch Degenerationsformen (Hungerformen) auf. — 3) Die Degenerationsformen fallen fort bei Zusatz von geringen Mengen Pepton Witte. In diesen Untersuchungen reichte 1 $^0/_{00}$ Gehalt aus, um normale Formen zu erhalten. — 4) Das Pepton kann ersetzt werden durch l-Cystin und l-Tyrosin. l-Leucin ist nur wenig geeignet, Tryptophan und d-Alanin sind ungeeignet. — 5) Die Ansprüche des I.B. an Nährböden sind danach, abgesehen von seinem Bedarf an X- und V-Substanz, annähernd ebenso einfach wie bei den bisher in gleicher Weise untersuchten anderen pathogenen Bakterien.

Zum Schluß der Arbeit möchte ich hierdurch Herrn Priv.-Doz. Dr. Kollath, der mir die Anregung zu dieser Arbeit gab und mich bei ihrer Durchführung in liebenswürdigster Weise unterstützte, meinen Dank aussprechen.

Literatur.

1) Braun, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 93. 1924. H. 1/4. — 2—3) Braun und C. E. Cahn-Bronner, Biochem. Ztschr. Bd. 131. 1922. S. 226 u. 272. — 4) Braun und Cahn-Bronner, Klin. Wochenschr., Jahrg. 1. 1922. S. 1824. — 5) Braun und Kondo, Ibid. Jahrg. 3. 1924. S. 10. — 6) Braun, Stamatelakis, Kondo und Goldschmidt, Biochem. Zeitschr. Bd. 145. 1924. S. 381. — 7) Dies., Ibid. Bd. 146. 1924. S. 573. — 8) Dies., Ibid. Bd. 153. 1924. S. 302. — 9) Cahn-Bronner, Ztschr. f. Immunitätsf. Orig. Bd. 33. 1921. S. 375. — 10) Davis, Journ. Inf. Dis. Vol. 21. 1917. p. 392. — 11) Ders., Ibid. Vol. 23, 1918. p. 248. — 12) Ders., Ibid. Vol. 29. 1917. p. 171. — 13) Knorr, Weichards Ergebn. Bd. 6. 1923. — 14) Ders., Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 92. 1924. S. 371 u. 385. — 15) Ders., Weichards Ergebn. Bd. 7. 1925. — 16) Knorr-Gehlen, Arch. f. Hyg. Bd. 94. 1924. H. 3. — 17) Kollath, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 93. 1924. S. 506. — 18) Ders., Ibid. Abt. I. Orig. Bd. 95. 1925. S. 158. — 19) Ders., Ibid. Bd. 95. 1925. S. 279. — 20) Ders., Klin. Wochenschr. Jahrg. 5. 1926. Nr. 21. — 21) Ders., Arch. f. Kinderheilk. Bd. 79. 1926. S. 195. — 22) Ders., Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 100. 1926. S. 97. — 23) Ders., Klin. Wochenschr. 1927. Nr. 1. — 24) Kruse, Allgem. Mikrobiologie. Leipzig (Vogel) 1910. — 25) Proskauer und Beck, Ztschr. f. Hyg. Bd. 18. 1894. H. 19. — 26) Proskauer und Capaldi, Ibid. Bd. 23. 1896. — 27) Thjötta, Journ. exp. Med. Vol. 33. 1921. p. 763. — 28) Thjötta und Avery, Ibid. 1921. p. 97. — 29) Dies., Ibid. Vol. 34. 1921. p. 455. — 30) Uschinsky, Centralbl. f. Bakt. Bd. 14. S. 10. — Aeltere Literatur siehe in Nr. 13, 15, 17, 18 u. 22.

Lebenslauf.

Am 1. Januar 1902 wurde ich in Hermsdorf, Kreis Görlitz, als Sohn des Pastors Johannes Petran geboren. Ich besuchte die Gymnasien zu Görlitz und Strehlen (Schlesien) und verließ letzteres im Frühjahr 1921 mit dem Zeugnis der Reife. Ich widmete mich dann dem Studium der Medizin, studierte zwei Semester in Greifswald, ein Semester in Jena und zwei Semester in Breslau und bestand dort Anfang Juli mein Vorexamen. Alle fünf klinischen Semester studierte ich weiter in Breslau und bestand dort am 18. Juni 1926 mein Staatsexamen. Das praktische Jahr absolvierte ich in Breslau an der medizinischen Poliklinik (5 Monate), an der Provinzial-Hebammen-Lehranstalt (1½ Monate) und in Görlitz am Stadtkrankenhaus (chirurgische Abteilung, 5½ Monate). Ich bin evangelischer Konfession, preußischer Staatsangehörigkeit.

Gottfried Petran.

Frommannsche Buchdruckerei (H. Pohle) in Jena.